Nicht f. d. Austausch

Über die Wirkung von Keimpflanzenextrakten auf das Wachstum von Fibroblastenkulturen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

genehmigt von der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Friedrich Wilhelms-Universität zu Berlin

Von

Friedrich Karl Paulmann

aus Berlin-Steglitz

Tag der Promotion: 25. Oktober 1937

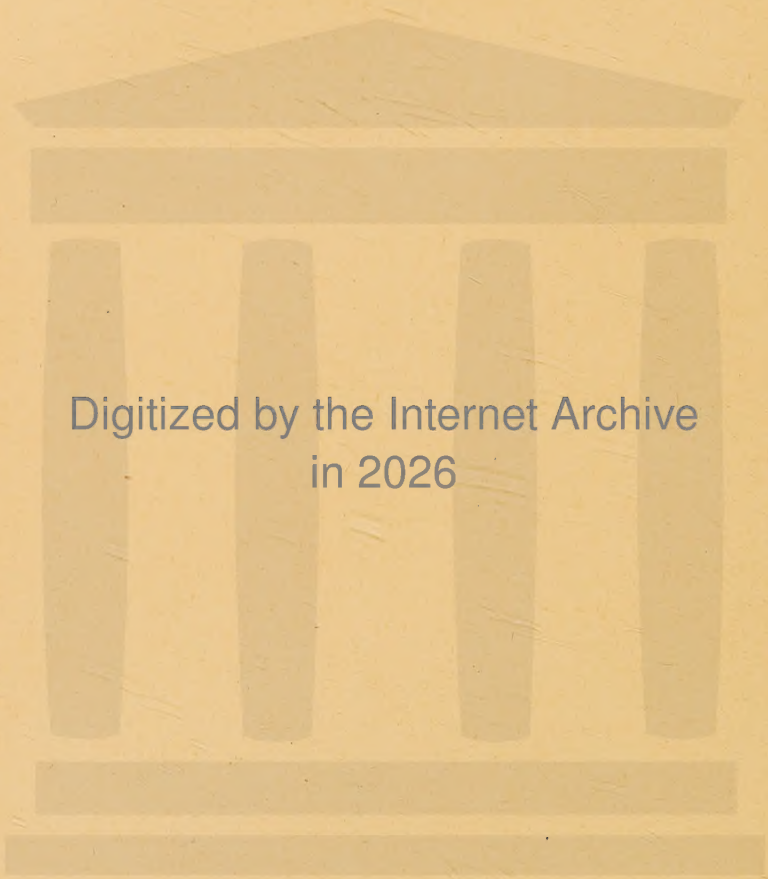
Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juni 1937

Jena

Gustav Fischer

1937

N 63


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535702_0199

Über die Wirkung von Keimpflanzenextrakten auf das Wachstum von Fibroblastenkulturen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

genehmigt von der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Friedrich Wilhelms-Universität zu Berlin

Von

Friedrich Karl Paulmann

aus Berlin-Steglitz

Tag der Promotion: 25. Oktober 1937

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juni 1937

Jena

Gustav Fischer

1937

Referenten: Prof. Dr. Robert Rössle

Prof. Dr. Max Hartmann

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Abdruck aus

Archiv für experimentelle Zellforschung, besonders Gewebezüchtung (Explantation)

1937, Band XX, Heft 3/4

Verlag von Gustav Fischer in Jena

Die positive Wirkung des Extraktes 8—9tägiger Hühnerembryonen auf Zellteilung und Zellwanderung ist aus Untersuchungen an Gewebekulturen seit langem bekannt. Es erschien von Interesse zu untersuchen, ob auch den Extrakten jugendlicher Pflanzen ein ähnlicher Einfluß auf die tierische Zelle zukommt. Versuche, die ich im Herbst 1934 begann, deuteten darauf hin, daß Keimpflanzenextrakte derartige Eigenschaften haben. Einige Exemplare des Axolotls und Kaulquappen des Grasfrosches, denen die Beine bzw. der Schwanz abgeschnitten waren, reagierten auf den Zusatz eines Preßsaftes von 5—6tägigen Maiskeimpflanzen zu ihrem Aquarienwasser mit einer anscheinend erheblichen Beschleunigung der Regeneration. Diese Wirkung ließ sich nur auf eine Förderung der Zellteilung zurückführen. Es war aber kaum möglich, vergleichbare Ergebnisse an diesen Tieren zu erzielen. Die Geschwindigkeit der spontanen, unbeeinflußten Regeneration variiert bei den einzelnen Individuen in zu breiten Grenzen. Außerdem läßt sich in solchen Untersuchungen, wie in allen Tierexperimenten, nicht entscheiden, auf welche Weise die Zellteilung ausgelöst wird. Vorgänge, die auf nervösem oder humoralem Wege Gewebstoffwechsel und Funktion beeinflussen und zur

Zellneubildung führen, können im Gesamtorganismus nicht von solchen unterschieden werden, die unmittelbar an der Zelle angreifen und sie im Sinne der formativen Reizung Virchows zur Vermehrung anregen.

Für diese Fragestellung ist die Gewebekultur die geeignete Methode. Quantitative Versuche sind in theoretisch idealer Weise anzustellen. Die Experimente können an Hälften einer Kultur ausgeführt werden, von denen die eine unter normalen, die andere unter Versuchsbedingungen gehalten wird. Ihre Wachstumsdifferenz wird verglichen mit dem Größenunterschied, der sich bei Züchtung zweier Schwesterhälften unter gleichen, normalen Verhältnissen ausbildet. Erfahrungsgemäß ist er nur gering. Die Gewebezüchtung bietet folglich so günstige Vergleichsobjekte zur Kontrolle, wie kaum eine andere Methode. Außerdem ist das Gewebe in vitro allen nervösen Reizen entzogen, und humorale oder allgemein stoffliche Einflüsse, die aus dem Organismus mitgebracht werden, erschöpfen sich in den ersten 6—10 Passagen. Aus diesen Gründen erschien eine eingehende Prüfung der Pflanzenextrakte mit den quantitativen Methoden der Gewebezüchtung aussichtsreich.

Das gebräuchlichste Verfahren zur Bestimmung der Wachstumsleistung einer Kultur ist die Arealmessung. Bei dieser Methode wird die Flächengröße der Kulturen während der Wachstumsperiode täglich ermittelt. Freilich ist die Zunahme der Wachstumszone einer Gewebekultur keineswegs allein auf Wachstumsvorgänge im eigentlichen Sinne zurückzuführen. Umlagerungen von vorhandenem Zellmaterial können zur Auflockerung und Ausbreitung des Gewebes führen und eine Größenzunahme vortäuschen. Tatsächlich spielen solche Vorgänge bei der Bildung der Wachstumszone einer Gewebekultur eine erhebliche Rolle: 60 % der Arealzunahme werden bei Fibroblastenkulturen auf Zellwanderung aus dem Mutterstück in die Peripherie zurückgeführt[1]). Auch andere Umstände, nämlich Zelluntergang[2]) und Veränderungen der Zellgröße, haben auf die Ausdehnung der Wachstumszone einen gewissen Einfluß. Darum geben Vergleiche der Areale von zwei Kulturen nicht ohne weiteres darüber Aufschluß, ob tatsächlich bei der einen, scheinbar größeren, ein vermehrter Substanzanbau stattgefunden hat. Auf einen wirklichen Gewebszuwachs kann aus einem größeren Flächen-

1) E. N. Willmer, Tissue culture. London 1935, S. 31.

2) Wieweit dieser negative Faktor, der bei Karzinomkulturen eine bedeutende Rolle spielt (A. Fischer und R. C. Parker, Brit. J. exper. Path. **10**, 312 (1929), auf die Flächengröße der Bindegewebskultur Einfluß hat, wurde noch nicht systematisch untersucht. In den vorliegenden Untersuchungen konnte er vernachlässigt werden, weil die mikroskopische Betrachtung bei Versuchs- und Kontrollhälften in dieser Hinsicht keinen Unterschied ergab.

areal nur dann geschlossen werden, wenn alle übrigen Faktoren, die die Größe der Wachstumszone mitbeeinflussen, als gleich angesehen und damit vernachlässigt werden können[1]). Praktisch ist das immer dann der Fall, wenn Zellgröße, Zellform und Zelluntergang in Versuchs- und Kontrollkulturen dieselben sind und die Lagerungsdichte in Mutterstück und Wachstumszone der beiden gleichmäßig ist. Wenn die Kulturen diese Bedingungen erfüllen, so sind die mit der Arealmessung gewonnenen Befunde durchaus verläßlich. Sie können noch gesichert werden durch eine zweite Methode, die Mitosenzählung. Mit diesem Verfahren bestimmt man ausschließlich den Faktor der Zellvermehrung. Es ist mit Sicherheit nur an der fixierten und gefärbten Kultur durchführbar und kann infolgedessen an ein und demselben Objekt nur einmal angewandt werden. Um mit ihm ein fortlaufendes Bild des Wachstums zu erhalten, müssen vergleichbare Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert und ausgezählt werden.

Weiter wurde als Maß für das Wachstum die Bestimmung des Trockengewichts nach Ablauf der Wachstumsperiode vorgeschlagen[2]). Die Zuverlässigkeit dieser Methode scheitert noch an der Unmöglichkeit, die Kulturen regelmäßig unbeschädigt aus dem Plasmakoagulum herauszulösen oder sie in flüssigen, leicht entfernbaren Medien in gleichmäßigem Wachstum zu erhalten. Bei dem geringen Gewicht der Kulturen ergeben Verluste von Teilen der Wachstumszone schon beträchtliche Fehlerquellen, wie ich mich in einigen Versuchen überzeugte[3]).

So stehen zwar auch in der Gewebekultur der eindeutigen Feststellung einer echten Wachstumsförderung nicht unerhebliche Schwierigkeiten entgegen. Immerhin ist die Gewebezüchtung wie keine andere Methode geeignet, eine wachstumsfördernde Wirkung qualitativ und quantitativ nachzuweisen, vorausgesetzt, daß die vorhandenen Meßmethoden mit Kritik angewandt werden.

Methodischer Teil.

a) Die Gewinnung der Keimpflanzen.

Die künstliche Keimung liefert nur bei ausgezeichnetem Samenmaterial gleichmäßige Ergebnisse. „Dippes kleiner gelber Perl-Mais" der Dippe A. G., Quedlinburg, und Sonnenblumensamen der gleichen Firma erwiesen sich als brauchbar.

---

1) Edm. Mayer, Arch. exper. Zellforschg **10**, 221 (1930).

2) R. Meier, Biochem. Z. **231**, 253 (1931). — H. Laser, Biochem. Z. **251**, 2 (1932).

3) Gleichlautende Ergebnisse mit der Methode der Wägung werden berichtet z. B. von E. Knake, Dtsch. Z. Chir. **243**, 634 (1934) und Caló, mündliche Mitteilung.

Zunächst wurden die Samen 12 Stunden in Leitungswasser vorgequollen. Die Keimung erfolgte dann in einem Keimschrank bei 27° unter geringem Lichtzutritt. Als Nährmedium bewährte sich eine Lösung von 2 g Kaliumnitrat, 0,2 g sek. Natriumphosphat und 0,2 g Magnesiumsulfat auf 1000 ccm Leitungswasser. Es erwies sich als vorteilhaft, sie in 12stündiger Periode für 1 Std. einzufüllen. In der Zwischenzeit jeweils nach dem Ablassen der Nährlösung genügt den Keimpflanzen bei hinreichender Luftfeuchtigkeit das anhaftende Wasser zur Entwicklung. In 6—7 Tagen erreicht unter solchen Bedingungen der junge Maissproß eine Höhe von 7—10 cm; aus der Koleoptile sind dann bereits die zwei folgenden Blätter herausgetreten. In diesem Zustand wird der Keimling mit Wurzel und den Resten des Samens geerntet.

b) Herstellung der Keimpflanzenauszüge.

Drei Vorbedingungen mußten bei der Herstellung der Keimpflanzenextrakte beachtet werden, damit eine Wirkung auf das Wachstum an Gewebekulturen nachgewiesen werden kann: Fällungs- und Extraktionsmittel, die das Wachstum möglicherweise beeinflussen, müssen restlos entfernt werden können; eine Anreicherung von zell- und wachstumsschädigenden Stoffen ist zu vermeiden; außerdem müssen die Zubereitungen durch Filtration oder Erhitzen sterilisiert werden können. Verschiedene erprobte Reinigungsverfahren verstoßen gegen eine der Bedingungen. Mancher Fehlschlag mit den üblichen Isolationsmethoden findet insbesondere durch eine gleichzeitige Anreicherung schädlicher Stoffe Erklärung.

Es wurde zunächst versucht, ob eine Extraktion mit wäßriger Salzlösung zum Ziel führt. Ein solches Vorgehen lag nahe, weil es sich bei der Herstellung des Embryonalextrakts in der Gewebezüchtung bewährt hat.

Beispiel: 100 g Keimpflanzen werden grob zerschnitten und im Vakuum bei 50° getrocknet. Sie liefern ungefähr 20 g Trockensubstanz, die im Mörser fein zerrieben werden. Von diesem Pulver wird 0,5 g in 18 ccm der Tyrode-III-Lösung[1]) gegeben und kurz bis 100° erhitzt. 3,5 ccm Tyrode I und 3,5 ccm Tyrode II werden nach Abkühlen hinzugefügt und die ganze Lösung mit $^n/_{10}$ Salzsäure auf $p_H = 6{,}8$ gebracht. Darauf wird der unlösliche Rückstand (etwa 0,2—0,3 g) abzentrifugiert. Die braungefärbte Flüssigkeit wird als Stammlösung bezeichnet und für die Versuche je nach Bedarf mit Tyrodelösung verdünnt.

1) Diese Art der Tyrodebehandlung ist aus dem Laboratorium Prof. v. Möllendorffs übernommen. Die Trennung in 3 Komponenten ermöglicht eine Hitzesterilisation. Es enthält Tyrode I $CaCl_2$; Tyrode II $NaHCO_3$; Tyrode III NaCl; KCl, $MgCl_2$ NaH_2PO_4 und Glukose. Sie werden nach dem Abkühlen miteinander in bestimmten Verhältnissen vereinigt.

Die auf diese Weise hergestellten Extrakte erwiesen sich häufig als unwirksam. Das mag seinen Grund darin haben, daß die Vermahlung nicht fein genug war. Ohne besonders geeignete Vorrichtungen ist sie auch kaum zu erreichen. Darum wurde nach anderen Verfahren gesucht, die wirksamen Stoffe freizulegen. Versuche, mit Azeton zu entwässern, schlugen fehl: Weder Extrakt noch Rückstand zeigten positive Wirksamkeit.

Günstigere Ergebnisse lieferte der Preßsaft der Pflanzen.

Beispiel: Die Keimpflanzen werden durch eine Fleischmaschine getrieben, dann der Pflanzenbrei durch ein Koliertuch abgepreßt. Der Preßsaft wird zentrifugiert und durch eine noch nicht gebrauchte Berkefeldkerze gesaugt. Das tiefbraune Filtrat galt als Stammlösung.

Bei dieser Art der Zubereitung hat die wirksame Komponente kolloidale Eigenschaften ähnlich einem Eiweißkörper: Sie ist nicht ultrafiltrabel und wird durch Erhitzen auf 70° ausgefällt. Auf dieser Beobachtung baute sich ein Verfahren zur Anreicherung des wirksamen Faktors durch Fällung auf.

Beispiel: Der zentrifugierte Preßsaft wird mit dem gleichen Volumen absoluten Alkohols versetzt. Der entstehende Niederschlag wird scharf abzentrifugiert und im Vakuumexsikkator getrocknet. 0,05 g der Trocknung werden in 18 ccm Tyrode III gegeben, kurz durch Erhitzen sterilisiert, dann je 3,5 ccm Tryode I und II hinzugefügt und auf ein pH = 6,8 gebracht. Der unlösliche Rückstand wird abzentrifugiert. Die so erhaltene Stammlösung war schwach gelblich gefärbt und wurde mit Tyrode verdünnt zur Anwendung gebracht.

Bemerkenswert ist, daß es durch die einfache Operation des Aufkochens mit Tyrode gelingt, die wirksame Gruppe von dem kolloidalen Träger abzulösen. Dieses Verhalten deutet auf eine sehr lockere Bindung, vielleicht durch Adsorption. Übrigens ließen sich in der überstehenden Flüssigkeit des Eiweißzentrifugats noch geringe Mengen des positiven Faktors nachweisen.

Versuchsteil.

a) Flächenmessung.

Versuchsanordnung:

Die Versuche wurden an Reinkulturen des Herzens und der Herzgefäße des Hühnerembryos zwischen der 7. und 50. Passage durchgeführt. Zu Versuch und Kontrolle dienten Schwesterhälften einer Kultur. Sie wuchsen in verschiedenen Carrel-Flaschen, aber unter gleichen Ernährungsbedingungen. Die Versuchshälften erhielten außerdem einen Anteil von Keimpflanzenextrakt zum Medium; er wurde in den Kontrollflaschen durch das gleiche Volumen Tyrodelösung ersetzt. Der Embryonalextraktzusatz wurde niedrig gehalten, damit sich eine Wachstumswirkung der Keimlingsextrakte desto stärker auswirken konnte. Dadurch erklären sich die zum Teil recht geringen absoluten Größen insbesondere der Kontrollkulturen. So ergab sich folgende Zusammensetzung der Nährmedien:

Versuch: In der festen Phase 0,3 ccm Plasma + 0,6 ccm Keimlingsextrakt + 0,03 ccm II. EE[1])

Flüssige Phase: 0,6 ccm Keimlingsextrakt.

Kontrolle: Feste Phase 0,3 ccm Plasma + 0,6 ccm Tyrodelösung + 0,03 ccm II EE.

Flüssige Phase: 0,6 ccm Tyrode.

Die Umrisse der wachsenden Kulturen wurden täglich mit 24facher Vergrößerung gezeichnet und planimetriert. Aus den ermittelten Werten ergab sich durch Berücksichtigung der Mikroskopvergrößerung die Fläche der Kulturen in qmm. Dem Vergleich von Versuchs- und Kontrollhälften wurden die am 3. und 4. Tag erreichten Areale zugrunde gelegt.

Bei den Versuchen in Carrel-Flaschen wurden 4 Keimlingsextrakte untersucht. Nr. 4, 6 und 71 waren Tyrodeauszüge aus getrockneten Keimpflanzen; Nr. 20 ein durch Berkefeld-Filter sterilisierter Preßsaft. Für jeden Extrakt wurde die optimale Konzentration in Vorversuchen an Deckglaskulturen ermittelt. Die so aufgefundene Dosierung erwies sich in allen damit angestellten Experimenten als wirksam, wenn auch in mehr oder weniger ausgeprägtem Maße, was wohl auf die verschiedene Reaktionsbereitschaft der einzelnen Kulturindividuen zurückgeführt werden darf. Zu hohe Konzentrationen machten sich durch eine Schädigung bemerkbar, deren äußere Kennzeichen stärkere Verfettung und eventuell Wachstumsstillstand waren. Bei optimaler Konzentration unterschieden sich die Kulturen äußerlich nicht von guten Stammkulturen.

Normale Streuung.

Die Wachstumsdifferenzen der Hälften einer Bindegewebskultur unter normalen, für beide gleichen Bedingungen werden meist mit 5—7 % angegeben. Diese Zahlen gehen auf Versuche Ebelings[2]) zurück und wurden unter Einhaltung idealster Voraussetzungen — nämlich unter bewußter Auslese einzelner Kulturen aus einem großen Material — erzielt. Da sie außerdem nur für Deckglaskulturen und eine Wachstumsperiode von 48 Stunden Geltung haben, ist es nicht angängig, sie auf Flaschenkulturen zu übertragen. Ebeling selbst berichtet über viel beträchtlichere Differenzen bei nicht ausgesuchten guten Stammkulturen. Es läßt sich exakterweise nicht umgehen, die Differenzen des Wachstums zweier Hälften in gleichem Nährmedium für die eigenen Züchtungsverhältnisse zu ermitteln. Damit gewinnt man für die Bewertung eventueller Wachstumsunterschiede zwischen zwei Schwesterhälften, von denen die eine als Kontrollhälfte und die andere unter den zu prüfenden Versuchsbedingungen wächst, sichere Grundlagen.

1) EE = Embryonalextrakt.

2) A. H. Ebeling, J. exper. Med. **30**, 531 (1919); **34**, 231 (1921).

Tabelle I bringt nun die Wachstumsgrößen von zusammengehörigen Kulturhälften, die unter normalen gleichen Bedingungen gezüchtet wurden. In Spalte 3 und 5 werden die Arealwerte jeder Kultur für den 3. und 4. Tag in qmm angegeben. Durch Subtraktion des kleineren vom größeren Wert ergibt sich die Wachstumsdifferenz in qmm. Sie wird in Spalte 4 und 6 angegeben, ausgedrückt in Prozenten des Areals der kleineren Hälfte.

Für die so gefundenen Werte wird unter Anwendung der üblichen Formeln der Mittelwert und der mittlere Fehler berechnet. Ein Teil der Kulturen wurde mit Embryonalextraktzusatz in der flüssigen Phase gezüchtet, der andere hingegen nur mit Tyrode. Diese unterschiedliche Behandlung geschah, um bei der Errechnung der durchschnittlichen Wachstumsunterschiede möglichst die unterschiedlichen Bedingungen der Versuchs- und Kontrollhälften zu berücksichtigen.

Tabelle I.

Wachstumsgröße der Hälften von Bindegewebskulturen bei gleicher Zusammensetzung des Mediums.

1	2	3		4	5		6
Wachstumsbedingungen	Nr. der Kultur	Areal am 3. Tag		Wachstumsdifferenz in %	Areal am 4. Tag		Wachstumsdifferenz in %
mit EE	37 a	4,7	5,5	17	7,2	9,3	29
	b						
„ „	38 a	6,4	5,8	10	8,0	7,5	7
	b						
„ „	39 a	9,1	8,4	8	13,6	14,1	4
	b						
„ „	40 a	8,8	8,9	1	12,2	15,2	25
	b						
„ „	41 a	9,5	9,0	6	15,1	13,3	14
	b						
„ „	42 a	10,9	9,0	21	14,1	13,4	5
	b						
„ „	43 a	4,0	4,7	18	5,5	5,3	4
	b						
„ „	44 a	6,0	4,4	36	7,6	5,6	36
	b						
ohne „	87 a	4,3	3,8	13	6,5	6,6	2
	b						
„ „	88 a	2,0	1,8	11	3,0	3,5	17
	b						
„ „	91 a	3,2	3,5	9	5,1	6,1	20
	b						
„ „	92 a	2,7	2,7	0	4,2	4,8	14
	b						
„ „	93 a	2,9	2,1	38	5,2	3,9	33
	b						
„ „	94 a	2,7	2,9	7	4,0	3,9	3
	b						
„ „	113 a	5,0	4,9	2	6,7	5,8	16
	b						
„ „	114 a	5,5	6,5	18	6,2	7,4	19
	b						

Mittelwert der Wachstumsunterschiede in % der kleineren Kultur
am 3. Tag: Mittelwert = 13; mittlerer Fehler = 3
am 4. Tag: Mittelwert = 16; mittlerer Fehler = 3

Versuchsergebnisse.

Für die Versuchskulturen wird in gleicher Weise Tabelle II aufgestellt. Dabei wird mit K die unter den Kontrollbedingungen wachsende Hälfte, mit V die mit Keimlingsextrakt behandelte Versuchshälfte bezeichnet. Die Spalten 3 und 5 enthalten die Arealwerte von K und V am 3. und 4. Versuchstag. Die Differenz beider, in qmm ausgedrückt, wird durch Subtraktion der Kontrollhälfte von der stets größeren Versuchshälfte gewonnen. Sie wird wie in Tabelle I umgerechnet in Prozent des Wertes der kleineren Hälfte, also der Kontrolle K (Spalte 4 und 6). Für die gefundenen Differenzen wird der Mittelwert und der mittlere Fehler bestimmt.

Es zeigt sich, daß der Mittelwert für die Differenzen von Kulturhälften unter gleichen Bedingungen (Tabelle I) am 3. Tag 13 % (am 4. Tag 14 %) des Arealwerts der kleineren ist. Die größte Anzahl aller Varianten liegt (unter Berücksichtigung der Streuung) zwischen **1—25** % (am 4. Tag **4—28**): Wächst aber (Tabelle II) nur je eine Hälfte unter diesen Verhältnissen, dagegen ihre dazugehörige Schwesterhälfte mit Zusatz von Keimpflanzenextrakt, so erhöht sich der Wachstumsunterschied zwischen beiden auf 48 % am 3. Tag (59 % am 4. Tag) und die größte Anzahl aller Varianten liegt zwischen **20—76** %) (am 4. Tag **26—92** %).

Der Keimlingsextrakt ruft also eine Größenzunahme hervor, die weit außerhalb der normalen Streuungsbreite zweier Kulturhälften liegt.

Diese Tatsache konnte ohne Mittelwertsberechnung schon abgeleitet werden aus der bloßen Betrachtung der Zahlenwerte in Tabelle II. Durchgehend zeigt nämlich die mit Keimlingsextrakt gezüchtete Versuchshälfte den größeren Arealwert. Wenn es sich bei dem Zusatz um eine indifferente Substanz handeln würde, so müßte nach allen Gesetzen der Wahrscheinlichkeit die Versuchshälfte auch häufig den kleineren Arealwert haben.

Wie oben ausführlich dargelegt, können die Arealwerte von Kulturen als Maß für ihr Wachstum nur dann herangezogen werden, wenn die Wachstumszonen der zu vergleichenden Kulturen dieselbe Beschaffenheit aufweisen. Spalte 8 in Tabelle II zeigt, daß das nicht in allen Fällen zutraf. Bei einigen Versuchskulturen (Nr. 95, 96, 102) wurde eine Auflockerung des Mutterstücks protokolliert. Dem stehen aber einige andere (Nr. 20, 24, 51, 101) gegenüber, bei denen die Wachstumszone in der Versuchskultur eine dichtere Zellagerung hatte. Aus diesen Gründen erscheint ein zahlenmäßiger Vergleich des gesamten Versuchsmaterials auf dem Boden der Arealmessung doch erlaubt.

Im übrigen werden ähnliche und zum Teil noch erheblichere Zunahmen der Flächengrößen an zahlreichen (etwa 200) Deckglaskulturen

Tabelle II.

Wachstumsgrößen von Bindegewebskulturenhälften, vergleichsweise mit und ohne Zusatz von Keimpflanzenextrakt.

1	2	3	4	5	6	8
Nr. des Extrakts und Verdünnung	Nr. der Kultur	Befund am 3. Tag		Befund am 4. Tag		Morphologische Beobachtungen
		Areal	Diff. in %	Areal	Diff. in %	
4 1:5	18 K	4,6	2	5,1	24	
	V	4,7		6,3		
4 1:10	20 K	8,3	39	9,0	58	Zellagerung
	V	11,5		14,2		V dichter
4 1:10	24 K	9,3	45	10,5	76	Wachstumszone
	V	13,5		18,5		V dichter
4 1:7	25 K	4,9	4	6,0	8	
	V	5,1		6,5		
4 1:7	27 K	4,8	21	5,6	45	
	V	5,8		8,1		
4 1:5	29 K	4,1	37	5,9	49	
	V	5,6		8,8		
4 1:5	30 K	5,0	50	6,8	37	
	V	7,5		9,3		
6 1:7	47 K	4,2	72	5,6	64	
	V	7,2		9,2		
6 1:7	48 K	4,3	26	5,7	42	
	V	5,4		8,1		
6 1:10	49 K	8,9	5	11,6	14	
	V	9,3		13,2		
6 1:10	50 K	7,7	42	11,3	43	
	V	11,9		16,2		
6 1:10	51 K	4,2	31	4,7	45	Zellagerung
	V	5,5		6,8		V dichter
6 1:10	52 K	3,7	43	4,5	40	
	V	5,3		6,3		
6 1:8	53 K	3,2	88	4,2	120	Zellen V etwas
	V	6,0		9,1		verfettet
6 1:8	54 K	2,5	92	3,3	115	Zellen V etwas
	V	4,8		7,1		verfettet
6 1:8	55 K	4,8	48	6,5	51	
	V	7,1		9,8		
20 1:12	71 K	3,2	78	3,7	81	
	V	5,7		6,7		
20 1:12	72 K	3,4	115	3,8	134	
	V	7,5		8,9		
71 1:10	95 K	4,6	57	5,9	63	Mutterstück V
	V	7,2		9,6		etwas auf-
						gelockert
71 1:10	96 K	5,6	39	7,0	49	Mutterstück V
	V	7,8		10,4		etwas auf-
						gelockert
71 1:12	101 K	2,5	52	2,8	54	Zellagerung V
	V	3,8		4,3		dichter
71 1:12	102 K	3,4	80	4,0	83	Mutterstück V
	V	6,1		7,3		schwach aufge-
						lockert, Zell-
						lagerung dichter

Mittelwert der Wachstumsunterschiede in % von K

am 3. Tag: Mittelwert = 48; mittlerer Fehler = $\pm$ 6

am 4. Tag: Mittelwert = 59; mittlerer Fehler = $\pm$ 7

beobachtet. Auch diese Befunde geben eine Grundlage für die Feststellung, daß der Keimlingsextrakt eine eindeutig positive Wirkung auf die Wachstumsgröße von Bindegewebskulturen ausübt.

b) Mitosenzählung.

Die Beobachtung, daß durch den Keimpflanzenextrakt verschiedentlich eine erhebliche Auflockerung des Mutterstücks eintritt, beweist seinen Einfluß auf die Zellwanderung. Es mußte daher besonders untersucht werden, ob und wieweit er auch die Zahl der Zellteilungen beeinflußt. Die Tatsache, daß häufig die Wachstumszone der Versuchskultur eine dichtere Zellagerung hat, ist freilich mit großer Wahrscheinlichkeit schon in diesem Sinne zu deuten. Das Ergebnis der Mitosenzählung bestätigte diese Annahme.

Versuchsanordnung:

Zu Versuch und Kontrolle wurden Hälften von Fibroblastenreinkulturen auf Deckgläsern gezüchtet. Das Nährmedium hatte folgende Zusammensetzung:

Versuch: 1 Tropfen Plasma + 1 Tropfen einer Mischung von 10 Teilen verdünnten Keimlingsextraktes und 1 Teil II. EE.

Kontrolle: 1 Tropfen Plasma + 1 Tropfen einer Mischung aus 10 Teilen Tyrode und 1 Teil II EE.

Somit wurde der Keimlingsextrakt des Versuches bei der Kontrolle durch Tyrodelösung ersetzt; die sonstige Zusammensetzung des Mediums war für beide Teile gleich. Ebenso wie bei den Kulturen für die Flächenmessungen wurde auch hier der Embryonalextraktzusatz niedrig gehalten.

Nach 15, 20, 25 und 30stündigem Aufenthalt im Brutschrank wurden die Kulturen in 2proz. Ringer-Formol fixiert und mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain gefärbt. Die Mitosen wurden im Totalpräparat mit 280facher Vergrößerung (Periplan-Okular und Apochromat) gezählt.

Wie bei den Flächenmessungen mußte zunächst die Streuungsbreite der Mitosenzahlen ermittelt werden, welche die Kulturhälften unter gleichartigen Züchtungsbedingungen aufweisen. Nur die Bezugnahme auf solche Vergleichszahlen ermöglicht es, die bei Versuchs- und Kontrollhälften vorhandenen Differenzen richtig zu bewerten.

Absolute Mitosenzahlen allein geben noch nicht ohne weiteres Einblick in die Proliferationsaktivität. Verschiedene Mitosenzahlen können bei Kulturen ungleicher Größe doch Ausdruck derselben Wachstumsintensität sein. Um bei ungleichen Kulturen vergleichbare Werte zu bekommen, wird darum gewöhnlich die Zahl der gleichzeitig vorhandenen Ruhezellen mitbestimmt (sogenannter Mitosekoeffizient). Wenn es sich um den Vergleich der Mitosenfrequenz bei Kulturhälften handelt, so erübrigt sich dies Verfahren. Denn halbierte Kulturen enthalten bei idealer Teilung theoretisch gleich viel Zellen; die praktisch doch vor-

handenen geringen Unterschiede können als bedeutungslos vernachlässigt werden. Die Wachstumszonen von Schwesterhälften gehen also theoretisch auf Mutterstücke von gleicher Zellzahl zurück, und auch die in diesen aufgefundenen Mitosen sind Abkömmlinge gleich großer Ausgangsmaterialien. Wenn nun die eine Hälfte unter Versuchsbedingungen eine größere Mitosenzahl produziert als ihre Vergleichshälfte, so bedeutet das, daß sich ihr ursprüngliches Zellmaterial in stärkerem Maße vermehrt als bei der gleich großen Kontrolle unter normalen Züch- tungsverhältnissen. Bei Benutzung von Hälften einer Kultur dürfen also die absoluten Mitosenzahlen direkt miteinander verglichen werden.

In Totalpräparaten kann man nur die Zellteilung in der Wachstumszone bestimmen. Diese methodisch bedingte Einschränkung dürfte aber kaum einen nennenswerten Fehler in das Gesamtresultat tragen. Denn unter normalen Züchtungsbedingungen findet man im Mutterstück nur immer sehr wenig Mitosen. Falls aber durch die Besonderheit der Versuchsbedingungen auch dieser Kulturteil beeinflußt werden sollte, so darf angenommen werden, daß es gleichsinnig wie in der Wachstumszone geschieht. Der Verzicht auf die Mutterstücksmitosen kann also das Resultat kaum verfälschen.

Eine Grenze zwischen Wachstumszone und Mutterstück ist mit einer für praktische Bedürfnisse hinreichenden Genauigkeit zu ziehen selbst in Fällen, wo das Mutterstück aufgelockert ist und sehr allmählich in die Wachstumszone übergeht. — Es soll nicht behauptet werden, daß die Mitosenzählung am Totalpräparat, wie sie durchgeführt wurde, methodisch ideal ist. In sehr dicht gewachsenen Kulturen ist es kaum zu vermeiden, daß die eine oder andere Mitose übersehen oder nicht einwandfrei erkannt werden kann; man muß sich darüber klar sein, daß die auf diese Weise ermittelten Werte nur den absoluten Mitosenzahlen angenäherte Verhältniszahlen darstellen. Auf die Bedingtheit der Werte soll weiter unten noch näher eingegangen werden.

Trotzdem sind wir überzeugt, daß die angewandte Methode wie keine andere geeignet ist, einen Einblick in die Verteilung der Zellteilungen bei Versuchs- und Kontrollkulturen zu geben.

In der Tabelle III werden die Befunde dargestellt. Es werden die absoluten Mitosenzahlen für Schwesterhälften unter gleichen Züchtungsbedingungen (Tabelle IIIa) mitgeteilt, wobei die Hälfte mit der kleineren Zahl willkürlich a genannt wird. Ferner wird in der nächsten Spalte die Differenz beider Werte angegeben und zwar umgerechnet in % der mitosenärmeren Hälfte, also von a. Die Werte in Tabelle IIIa sollen zum Vergleich für die Tabelle 3b dienen. Hier werden die absoluten Mitosenzahlen der Hälften unter Kontrollbedingungen (K) bzw. unter

Tabelle III.

Mitosenzählungen an Fibroblastenkulturhälften.

a Normale Streuung der Mitosenzahlen von Hälften bei Züchtung unter gleichen Bedingungen				b Mitosenzahlen von Hälften vergleichsweise mit und ohne Zusatz von Keimpflanzenextrakt			
Nr. der Kultur	Anzahl der Mitosen		Abweichung in % von a	Nr. der Kultur	Anzahl der Mitosen		Abweichung in % von K
	in a	in b			in K	in V	
Nach 15 Stunden							
7146	16	21	30	7156	9	19	110
7152	7	8	10	7155	5	28	460
7149	10	11	10	7447	8	16	100
7321	7	9	30	7531	12	26	120
7319	20	23	20	7532	30	27	10
7441	11	14	30	7533	19	32	70
7443	19	19	0	7530	14	26	100
7320	8	11	40	7535	11	25	130
7482	11	12	10	7538	23	24	0
7529	6	10	70	7539	19	33	70
Nach 20 Stunden							
7039	16	20	30	5041	7	25	260
7044	25	27	10	5043	6	11	80
7045	39	41	10	5044	7	26	270
7046	30	32	10	5422	19	50	160
7048	39	41	10	5879	27	121	350
7040	40	45	10	5982	17	64	280
7200	17	22	30	5983	30	87	190
5682	20	23	20	5984	25	76	200
5684	18	21	20	6244	20	25	30
7528	24	31	30	6284	11	40	260
Nach 25 Stunden							
7175	13	16	20	7282	12	25	110
7196	9	13	50	7268	9	20	120
7198	7	7	0	7278	20	31	60
7275	7	8	10	7414	20	40	100
7277	6	7	20	7412	17	38	120
7474	10	11	10	7411	31	78	150
7475	9	13	50	7049	17	79	360
7490	20	25	30	7050	27	59	120
7491	30	39	30	7526	27	52	90
7527	19	25	30	7550	22	73	230
Nach 30 Stunden							
7283	17	20	20	7291	34	62	80
7285	16	20	30	7293	25	48	90
7284	15	16	10	7438	15	44	190
7286	17	21	20	7488	20	65	230
7211	20	22	10	7486	13	31	140
7213	6	7	20	7487	10	25	150
7214	13	14	10	7484	27	44	60
7215	10	10	0	7499	19	50	160
7220	7	9	30	7493	10	62	520
7219	21	22	0	7495	20	61	210

Zusatz von Keimpflanzenextrakt angegeben. Mit einer einzigen Ausnahme sind die Zahlen bei V höher als bei K. Die nächste Spalte enthält die Differenz V—K umgerechnet in % von K.

In Tabelle IV wurden die Mittelwerte der prozentualen Abweichung für jede der vier Streuungs- und Versuchsgruppen angegeben.

Tabelle IV.
Mittelwerte der prozentualen Abweichung.

Versuchsdauer	Mittelwert der Streuung	Mittelwert der Versuche
15 Stunden	25 %	115 %
20 „	18 %	208 %
25 „	25 %	136 %
30 „	15 %	172 %

Diese Zahlen sprechen eindeutig für eine fördernde Wirkung der Keimpflanzenextrakte auf die Zellteilung. Sie ist nach 15 Stunden noch nicht so gleichmäßig ausgeprägt: Der gleiche Keimpflanzenextrakt, der bei einer Reihe von Kulturen (7531—39) gut wirksam gefunden wurde, ergab bei anderen keinen Anstieg bzw. sogar eine geringere Mitosenzahl gegenüber der Kontrolle (Nr. 7538, 7532).

Nach längerer Einwirkung auf die Kulturen, d. h. bei 20, 25 und 30stündiger Bebrütung, ist der positive Einfluß des Zusatzes dagegen durchgehend. Die Mitosenzahlen der Versuchshälften übertreffen stets die der Kontrollhälften und zwar um 30—520 % (mit Ausnahme von Kultur 7532). Daß der Grad der Wirkung, wenn auch immer positiv, so doch verschieden stark ausgesprochen ist, darf wohl auf die Verschiedenheit der Extrakte und auf die verschiedene Reaktionsbereitschaft der Kulturen zurückgeführt werden. Denn die Größe des Untersuchungsmaterials brachte es mit sich, daß die Experimente sich über eine längere Zeit erstreckten. Jedem Gewebezüchter ist es aber bekannt, daß die Proliferationskraft der Kulturstämme unvermeidbaren Schwankungen unterliegt. Da ferner die zu prüfenden Extrakte, wie oben dargelegt, mit der Zeit ihre Wirksamkeit einbüßen, konnten die gesamten Mitosenzählungen auch nicht mit ein- und demselben, stets gleichbleibenden Extrakt durchgeführt werden. Insgesamt mußten 18 verschiedene Pflanzenextrakte in diesen Teil der Versuche einbezogen werden.

Zur Methode der Mitosenzählung am Totalpräparat muß noch auf einige Feststellungen hingewiesen werden. Solange die Wachstumszone locker ist, bietet die Zählung der Zellteilungen keinerlei Schwierigkeiten. Dichtgelagerte und mehrschichtige Wachstumszonen sind dagegen nicht sicher absolut genau auszuzählen.

Abgesehen von der Güte der optischen Hilfsmittel spielt die jeweilige Disposition des Untersuchers eine bedeutende Rolle für die Ergebnisse. Um einen Einblick in die Verläßlichkeit der erhobenen Zahlen zu gewinnen, zählten wir besonders dichte Wachstumszonen mehrfach und unter gegenseitiger Kontrolle verschiedener Untersucher. Die Differenzen waren sehr beträchtlich. 5879 V ergab beispielsweise in zwei Zählungen an verschiedenen Tagen 78 bzw. 121 Mitosen. Solche extremen Unterschiede traten aber stets nur bei Auszählung besonders dichter und vielschichtiger Kulturen auf, das bedeutet in unserem Fall durchgehend nur bei Versuchshälften und zwar ließ doppelte und dreifache Zählung die Zahl immer ansteigen, niemals absinken. Dabei wurden stets nur einwandfreie, sicher diagnostizierbare Mitosen gerechnet. Es ist also möglich, daß die angegebenen Zahlen zu tief liegen, d. h., daß in Wirklichkeit noch mehr Mitosen in diesen besonders dicht gewachsenen Versuchshälften sind, als angegeben wurden. Mehrfache Zählung der stets viel leichter auszuzählenden Kontrollhälfte ergab nur gelegentlich ein sehr geringes Ansteigen um etwa 2—5 Mitosen pro Kultur. Verschiedentlich änderte sich das Resultat bei mehrfacher Zählung auch garnicht.

Für das Gesamtresultat bedeutet das aber nur, daß der fördernde Einfluß der Keimpflanzenextrakte auf die Zellteilung in Wirklichkeit noch stärker ist, als er aus den Tabellen hervorgeht.

Für die Mitosenzählung an Wachstumszonen von Totalpräparaten folgt aus unseren Erfahrungen allgemein, daß genau zutreffende Zahlen nur in einem Teil der Fälle, nämlich an dünnschichtig gewachsenen Kulturen zu erheben sind. Für unsere besondere Aufgabe darf jedoch festgestellt werden, daß die der Methode anhaftenden Schwächen nicht die Richtigkeit der Behauptung ins Wanken bringen können, daß nämlich der Keimpflanzenextrakt eine fördernde Wirkung auf die Zellteilung hat. Man hätte die Unsicherheit der Methode umgehen können, wenn die Mitosen nicht im Totalpräparat sondern an Serienschnitten der Kultur untersucht worden wären. Jedoch hat diese Methode Nachteile, die ihren Wert praktisch unter den der Zählung am Totalpräparat herabsetzen. Wegen des damit verbundenen Arbeitsaufwandes ist die Zählung an Serienschnitten nur an einer sehr geringen Zahl von Kulturen durchführbar[1]). Uns erschien es wichtiger, zwar nur die Größenordnung der Mitosenzahlen festzustellen, dafür aber einen Einblick in die normalen und unter Versuchsbedingungen auftretenden Schwankungen zu bekommen, als die exakte Mitosenzahl für einige ganz wenige Kulturen ohne die Möglichkeit, die Differenzen zwischen Kontrolle und Versuch richtig zu bewerten.

c) Fortgesetzte Züchtung mit Keimpflanzenzusatz.

Einige Deckglas-Kulturen wurden mehrere Passagen mit Keimpflanzenextrakt gezüchtet. Mikroaufnahme Nr. 3 und 4 zeigt die Unterschiede von 2 ursprünglich gleich großen Hälften einer Fibroblastenkultur. Der Versuchskultur wurde 5 Passagen lang Keimlingsextrakt zum Nährmedium zugesetzt, während die Kontrolle statt dessen Tyrodelösung erhielt. Die Kontrollhälfte hat nur ein recht geringes Residualwachstum, und der beträchtliche Unterschied zu der mit Keimpflanzenextrakt gezüchteten Versuchshälfte ist sehr eindrucksvoll. Auch

1) A. Fischer, und R. C. Parker, Brit. J. exper. Path. **10**, 312 (1929).

hieraus geht hervor, daß der Keimlingsextrakt nicht nur die Zellwanderung stimuliert, sondern daß er den Zellen einen Substanzanbau ermöglicht.

d) Die Wirkung ungekeimten Samens.

Bei der Überlegung, welcher Art das wirksame Prinzip in den Extrakten sein könnte, ergab sich eine Vorfrage, die dem Experiment zugänglich ist: Wenn der fördernde Stoff zur Gruppe der Vitamine oder zu den Hefewuchsstoffen gehört, wäre es denkbar, daß er auch aus ungekeimten Samen gewonnen werden könnte. Denn es ist bekannt, daß ruhende Samen reich an biologisch hochaktiven Stoffen sind. So wurden in ihnen u. a. das Vitamin A, die Vitamine der B-Gruppe, Vitamin E und der Hefewuchsstoff Biotin festgestellt.

Falls sich diese Möglichkeit bestätigen sollte, so würde das für die spätere Aufarbeitung einen großen Vorteil bedeuten. Die Aufbereitung des wasserarmen Samens wäre technisch einfacher und der Erfolg auch geringeren Schwankungen unterworfen als die Extraktion der Keimpflanzen.

Bisher ergab die Prüfung der ungekeimten Samen allerdings keinen Anhaltspunkt für die Gegenwart von wachstumsfördernden Stoffen. Extrakte aus Mais- und Sonnenblumensamen hatten keine positive Wirkung auf das Wachstum von Gewebekulturen: Niedrige Konzentrationen waren indifferent und stärkere schädigten die Zellen.

Aus je 0,5 g getrockneten, gepulverten Mais- und Sonnenblumensamen wurde mit Tyrodelösung in der für Keimpflanzen angegebenen Methode ein Extrakt hergestellt. Die Wachstumsbeeinflussung wurde an Fibroblastenkulturen mit der Methode der Flächenmessung geprüft. Für die Verdünnung 1:2 betrug der Mittelwert der Abweichung der Versuchs- von den Kontrollkulturen bei Sonnenblumensamen — 27 %, bei Maissamen — 26 %. Auch morphologisch wurde eine Schädigung der Zellen beobachtet, die sich in stärkerer Verfettung der Zellen und lockerer Wachstumszone kenntlich machte. Die Konzentrationen 1:5, 1:10 und 1:20 ergaben äußerst geringe, teils positive, teils negative Abweichungen, die noch innerhalb der Fehlergrenzen blieben. Sie müssen demnach als indifferent angesehen werden.

Aus den bisherigen Versuchen geht also hervor, daß Tyrodeauszüge ungekeimter Mais- und Sonnenblumensamen das Wachstum von Fibroblastenkulturen nicht in positivem Sinne beeinflussen. Trotzdem können noch keine bindenden Schlüsse über das Fehlen des Wachstumsfaktors der Keimpflanzen in den Samen gezogen werden. Denn es wäre denkbar, daß er in geringerer Konzentration vorhanden ist, daß aber seine Wirkung durch mitextrahierte schädigende Faktoren überlagert wird.

e) Die Lokalisation des wachstumsfördernden Stoffes in den Keimpflanzen.

Ferner wurde versucht festzustellen, in welchem Teil der Keimpflanzen der wirksame Faktor lokalisiert ist. Auch diese Versuche lassen noch keine endgültige Entscheidung zu. Die bisherigen Experimente sprechen dafür, daß bei den Sonnenblumenkeimpflanzen besonders die Keimblätter und bei Maiskeimlingen in erster Linie die Halme das wirksame Prinzip enthalten.

Wurzeln und Hypokotyl der Sonnenblumen waren bei gleicher Konzentration (1:16) schädigend auf die Kulturen. Erst eine weitere Verdünnung (1:32) ergab eine schwache Förderung, die aber noch innerhalb der Fehlergrenzen lag. Die Maiskeimpflanzen wurden getrennt in Endosperm, Wurzeln und Halm (Blätter, Koleoptile, Hypokotyl), dem noch das Schildchen zugerechnet wurde. Die Wurzeln schädigten noch in üblicher Verdünnung, während das Endosperm weitgehend indifferent war und erst in verhältnismäßig hoher Konzentration (1:2) das Wachstum hemmte.

Gerade die Wurzelauszüge zeigen deutlich den Einfluß gleichzeitig vorhandener schädigender Stoffe. Es muß daher nochmals betont werden, daß sich diese Versuche, ebenso wie die Prüfung des ungekeimten Samens, erst nach weiterem Ausbau der Anreicherungsmethoden in einwandfreier und sinnvoller Weise durchführen lassen. Aus diesem Grunde wurde hier auch auf eine zahlenmäßige Wiedergabe der Messungsergebnisse verzichtet.

Immerhin haben diese Versuche einen gewissen praktischen Wert für die Aufarbeitung der Keimpflanzen; man wird sich für die Isolierungsversuche zunächst auf die hervorragend wirksamen Teile beschränken.

Diskussion der Ergebnisse.

Wenngleich die Untersuchungen in mancher Hinsicht noch nicht als abgeschlossen gelten können, so lassen die bisherigen Resultate doch schon eine Zusammenfassung und Deutung zu.

Die experimentelle Prüfung ergab einwandfrei, daß Extrakte und Preßsäfte von Mais- und Sonnenblumenkeimpflanzen eine Steigerung des Flächenwachstums an Hühnerfibroblastenkulturen hervorrufen. Diese Substanzen haben also einen Einfluß auf die Wanderung und, wie es die Mitosenzählungen ergaben, auch auf die Teilung der tierischen Zelle[1]).

1) Bisher wurden die Versuche nur an embryonalen Zellen durchgeführt. Wie stationäres Gewebe auf die Keimlingsextrakte anspricht, ist noch nicht untersucht.

Der wirksame Faktor ist seiner Natur nach noch unbekannt: nur durch einige Eigenschaften läßt er sich schon etwas näher kennzeichnen. Sein Verhalten im Preßsaft, nämlich Hitzeunbeständigkeit, Fällbarkeit mit 50proz. Alkohol und das negative Ergebnis der Ultrafiltration, würden auf ein Protein, vielleicht ein Globulin, hinweisen. Durch Extraktion getrockneter Keimpflanzen und der getrockneten Alkoholfällung gelang es aber, ihm in einen mäßig hitzestabilen, durch 50proz. Alkohol nicht fällbaren Körper überzuführen. Diese entgegenstehenden Beobachtungen werden verständlich durch die Annahme, daß die wirksame Komponente nicht selbst ein Eiweiß ist, sondern nur locker an ein solches gebunden ist.

Außerdem verliert der Faktor, unabhängig von der Art der Aufarbeitung, nach einiger Zeit seinen Einfluß auf die Zelle. Wahrscheinlich ist diese beschränkte Haltbarkeit durch Oxydation der aktiven Gruppe zu erklären.

Weitere kennzeichnende Merkmale wurden bisher nicht gewonnen, da die systematische Reinigung vorläufig zurückgestellt wurde. Es ist deshalb noch unmöglich, zu entscheiden, ob die Wirkung auf einen bereits bekannten oder einen neuartigen Stoff zurückgeht. Auf alle Fälle ist die Auswahl auf die hochwirksamen physiologischen Substanzen wie Fermente, Vitamine und Hormone beschränkt; denn der niedrige Schwellenwert von 0,002 % im Medium, wie er für die Eiweißfällung festgetellt wurde, schließt andere rein nutritive Stoffe von vornherein aus.

Es lag zunächst nahe, die pflanzlichen Wuchsstoffe der Auxin- und Bios-Gruppe als die Urheber der Wachstumsbeschleunigung anzusehen. Für das Auxin a und b konnte aber eine positive Wachstumswirkung auf Fibroblastenkulturen nicht nachgewiesen werden, eher trat eine Schädigung ein[1]). Bei den Faktoren der Bios-Gruppe ist wiederum eine kurzfristige Haltbarkeit nicht bekannt geworden. Meso-Jnosit, das Bios I, ist ein durchaus stabiler Körper[2]) und die Beständigkeit des Bios II läßt eine Aufarbeitung durch einstündiges Kochen zu[3]); ein Verfahren, das bei den Keimpflanzenextrakten zum absoluten Verlust der fördernden Wirkung führt. Aus diesen Gründen ist eine Identität der pflanzlichen Wuchsstoffe mit dem auf die tierische Zelle wirksamen Körper wohl sicher abzulehnen. —

---

1) A. Fischer, zit. in Kögl, Fritz, A. J. Haagen-Smit und B. Tönnis, Hoppe-Seylers Z. **220**, 168 (1933).

2) E. V. Eastcott, J. physic. Chem. **32**, 1094 (1928).

3) Kögl, Fritz und B. Tönnis, Hoppe Seylers Z. **242**, 43 (1936.)

Dagegen zeigt der HG-Faktor von Kollath[1]), der auch auf die Zellvermehrung Einfluß hat, in verschiedener Hinsicht eine große Ähnlichkeit. Kollath stellte bei Wachstums- und Umbildungsprozessen an der Knochen- und Knorpelgrenze von Rattenrippen fest, daß die Vitamine A, B_1, C und D auf die Zellneubildung keine Wirkung haben. Erst in Verbindung mit einem besonderen in Hefe und keimendem Getreide aufgefundenen Stoff sollen sie normales Wachstum ermöglichen. Dieser sogenannte HG-Faktor ist hitzebeständig und sauerstoffempfindlich, ähnelt in diesen Eigenschaften also dem Wirkstoff der Keimpflanzen. — Leider lassen sich Ergebnisse, die am Gesamtorganismus erzielt worden sind, nicht ohne Einschränkung mit solchen an Gewebekulturen vergleichen. Eine Prüfung des HG-Faktors an Explantaten liegt aber nicht vor.

In gewissem Umfange kann man die Versuche Heatons[2]) zum Vergleich und zur weiteren Aufklärung heranziehen. Dieser Autor arbeitete nämlich ebenso wie Kollath mit Hefe als Ausgangsmaterial. Er setzte wäßrige Extrakte dem Züchtungsmedium von Gewebekulturen zu. Dabei fand er zwar eine Beförderung des Epithels, gleichzeitig aber auch eine Hemmung des Bindegewebswachstums[3]). Die im wässrigen Hefeauszug aufgefundenen Stoffe können also nicht mit unserem wirksamen Faktor identisch sein. Da nicht anzunehmen ist, daß Heaton bei seinen eingehenden Untersuchungen einen das Bindegewebswachstum fördernden Stoff übersehen hat, erscheint für Kollaths Substanz ein direkter Einfluß auf die Zellen unwahrscheinlich. Man darf wohl vermuten, daß der HG-Faktor nicht im Sinne der formativen Reizung, sondern auf einem komplexen Wege wirksam wird. Eine endgültige Entscheidung über Identität oder Verschiedenartigkeit des HG-Faktors und des zellwirksamen Prinzips läßt sich aber erst treffen, wenn die Isolierung in beiden Fällen fortgeschritten ist.

Damit ist die Literatur über Wachstumsbeeinflussung durch pflänzliche Extrakte bereits erschöpft[4]), ohne daß daraus Aufschlüsse über das Wesen des wirksamen Stoffes der Keimpflanzen gewonnen werden konnten.

---

1) W. Kollath, Arch. exper. Path. **167**, 464, 478, 507, 521, 538; **170**, 385, 635, 6666 (1933).

2) T. B. Heaton, J. of Path. **29**, 293 (1926).

3) Diese Wirkung ist wohl sicher auf die Anwesenheit von grenzflächenaktiven Stoffen zurückzuführen: M. Katzenstein und E. Knake, Z. f. Krebsforschg **33**, 378 (1931).

4) Ein pflanzliches Wundhormonpräparat der Firma Madaus ließ in vitro jede Wirkung auf Zellteilung und Wanderung vermissen.

Etwas fruchtbarer für die Aufklärung seiner Eigenart ist ein Vergleich mit Untersuchungsergebnissen über den Embryonalextrakt. Eine gewisse Gleichartigkeit der chemischen Eigenschaften der zellwirksamen Komponenten beider Stoffgemische läßt auf eine Identität bzw. Verwandtschaft schließen. Es wurde nämlich für den Embryonalextrakt[1]) wie für den Keimlingspreßsaft festgestellt, daß der aktive Faktor größtenteils an einen kolloidalen Träger und zwar an ein Globulin gebunden ist. Ebenso läßt bei beiden die Wirksamkeit bald nach. In diesen Punkten besteht also Übereinstimmung. Allerdings ist es im Embryonalextrakt noch nicht gelungen, die wirksame Gruppe von ihrem kolloidalen Träger abzulösen. Immerhin erscheint das Fehlen einer solchen Beobachtung nicht als Grund, eine nahe Verwandtschaft der beiden Stoffe abzulehnen. Über den Mechanismus ihrer Wirkung läßt sich noch nichts aussagen; vielleicht darf man eine Förderung der aeroben Glykolyse oder eine Beeinflussung des Eiweißstoffwechsels annehmen.

In Fortführung der Versuche über den Keimpflanzenextrakt soll zunächst an eine weitere Anreicherung des wirksamen Faktors herangegangen werden.

Es bleibt auch noch zu untersuchen, wie sich der Einfluß von Keimpflanzenextrakten bei Dauerzüchtung auf das Wachstum auswirkt.

Tafelerklärungen.

Tafel 12.

Fig. 1. Flaschenkultur Nr. 102b mit Zusatz von Keimlingsextrakt gezüchtet. Vergrößerung 20 ×.

Fig. 2. Flaschenkultur Nr. 102a als Kontrolle mit Zusatz von Tyrodelösung gezüchtet. Vergrößerung 20 ×.

Tafel 13.

Fig. 3. Deckglaskultur 694b über 5 Passagen mit Zusatz von Keimpflanzenextrakt gezüchtet. Vergrößerung 20 ×.

Fig. 4. Deckglaskultur 694a, ursprüngliche Schwesterhälfte von 694b als Kontrolle 5 Passagen mit Tyrodelösung gezüchtet. Vergrößerung 20 ×.

---

1) Alb. Fischer, Gewebezüchtung. Müller u. Steinicke, München 1930, S. 20—24.

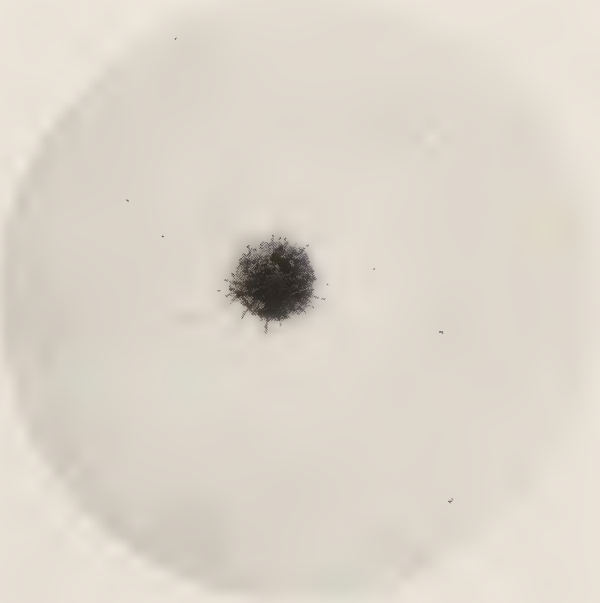
1

2

Paulmann

Verlag von Gustav Fischer in Jena

3



4

Paulmann

Verlag von Gustav Fischer in Jena

Lebenslauf.

Ich, Friedrich Karl Paulmann, Sohn des Kunstmalers Friedrich Paulmann und seiner Ehefrau Margarete geb. Hahn, wurde geboren am 4. August 1910 zu Berlin-Steglitz. Von Oktober 1916 bis Ostern 1929 besuchte ich das Paulsen-Realgymnasium zu Berlin-Steglitz. Ab Oktober 1929 widmete ich mich an der Universität Berlin dem Studium der Zoologie, Botanik und Chemie. Im Oktober 1933 beantragte ich meine Beurlaubung und trat als wissenschaftlicher Mitarbeiter in das Laboratorium der „Studiengesellschaft für Keimionisierung" ein. Mein Arbeitsgebiet war Keimungsphysiologie und Ionenaufnahme während des Keimprozesses. Juli 1935 beendete ich diese Untersuchungen. Seither arbeite ich an der Abteilung für experimentelle Zellforschung am Pathologischen Institut der Charité an meiner Dissertation.

Dem Direktor des Instituts, Herrn Prof. Dr. Rössle, und meiner Abteilungsleiterin, Fräulein Dr. Else Knake, bin ich für die Förderung meiner Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.